基于 COI 基因 5′端与 3′端序列田间常见粉虱的分子鉴定

李小凤[1]，田　虎[1]，张金良[2]，张桂芬[1,3,*]，陈苗苗[1]，万方浩[1,3]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 北京市植物保护站，北京 100029；3. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心，北京 100193）

摘要：【目的】粉虱种类繁多，个体微小，其种类识别与鉴定常需借助分子生物学技术。本研究旨在明确线粒体 COI 基因（mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene）5′端和 3′端序列对常见种类粉虱识别鉴定的可行性。【方法】以我国田间常见的 16 种粉虱为对象，以 COI 基因 5′端（641 bp）和 3′端（738 bp）序列为靶标进行比对分析，以 MEGA 5.10 软件的 K2-P 模型计算种内与种间遗传距离，以邻接法（NJ 法）构建进化树并进行系统发育分析。【结果】当以 5′端为靶标时，16 种粉虱的种内平均遗传距离为 0.0015，种间平均遗传距离为 0.2897，种间遗传距离为种内遗传距离的 193.1 倍；而且种内、种间遗传距离没有重叠区域。当以 3′端为靶标时种内平均遗传距离为 0.0007，种间平均遗传距离为 0.2817，种间遗传距离为种内遗传距离的 402.4 倍；但桑粉虱 *Pealius mori* 与烟粉虱 *Bemisia tabaci* Asia II 1 的种内和种间遗传距离重叠。系统发育分析结果显示，以 5′端为靶标时，16 种粉虱可以形成独立的进化分支；以 3′端为靶标时，除桑粉虱与传统分类学不一致外，其余种类均可形成独立的分支。【结论】结果表明，5′端序列更适用于基于 DNA 条形码技术的物种识别鉴定研究。

关键词：粉虱；COI 基因；系统发育分析；遗传距离；物种鉴定；DNA 条形码

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2014)04-0466-11

Identification of common whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) in China based on the 5′- and 3′-end sequences of the COI gene

LI Xiao-Feng[1], TIAN Hu[1], ZHANG Jin-Liang[2], ZHANG Gui-Fen[1,3,*], CHEN Miao-Miao[1], WAN Fang-Hao[1,3] (1. State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China; 3. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】 Whiteflies belong to a species-rich family with small body size. Identification of whitefly species is commonly done with the aid of molecular methods. This study aims to clarify the effectiveness of the 5′- and 3′-ends of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene sequences in molecular identification of common whiteflies species. 【Methods】 The COI gene sequences in 16 whitefly species common in China were amplified using the 5′- and 3′-end universal primers. The obtained 5′-end (641 bp) and 3′-end (738 bp) fragments were sequenced. The intra- and inter-species genetic distances were calculated using the Kimura-2-Parameter model; the phylogenetic trees were established by a neighbor-joining (NJ) method of the MEGA (Version 5.10) software. 【Results】 The identification based on the phylogenetic tree was consistent with those based on morphological characteristics for the 16 whitefly species when the 5′-end fragments were analyzed. However, when the 3′-end fragments were analyzed, the identification results based on the phylogenetic tree were not consistent with those based on morphological characteristics in the case of *Pealius mori* and *Bemisia tabaci* Asia II 1. The average inter-species genetic distance was 193.1 (0.2897 *vs*. 0.0015) and 402.4 (0.2817 *vs*. 0.0007) times higher than the corresponding intra-species genetic distance for the 5′- and 3′-end fragments, respectively. There was no overlap between inter- and intra-species

基金项目：国家“973”计划项目(2009CB119200)；公益性行业(农业)科研专项(201103026, 201303019)

作者简介：李小凤，女，1987 年 10 月生，河北衡水人，硕士研究生，研究方向为入侵生物学，E-mail: lixiaofeng091688@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhangguifen@caas.cn

收稿日期 Received: 2014-01-17；接受日期 Accepted: 2014-03-25

genetic distances when the 5′-end fragments were analyzed, but overlap was observed between *P. mori* and *B. tabaci* Asia II 1 when the 3′-end fragments were analyzed. 【Conclusion】The DNA barcoding based on the 5′-end fragment of the partial COI gene can provide a rapid and accurate identification of these whitefly species.

Key words: Whitefly; COI gene; phylogenetic analysis; genetic distance; species identification; DNA barcoding

粉虱类昆虫是世界性害虫，属于昆虫纲（Insecta），半翅目（Hemiptera），粉虱科（Aleyrodidae），世界已知种类 1 550 余种，隶属 161 个属（Martin and Mound, 2007）。我国已报道的粉虱约有 170 种，其中仅海南省就有 57 种（朱文静和符悦冠, 2013）。粉虱类害虫主要通过以下 3 种方式进行危害：一是直接刺吸植物汁液，造成植株衰弱、干枯，并可引起生理异常；二是分泌大量蜜露，诱发煤污病；三是传播病毒，诱发植物病毒病流行。而传播病毒所造成的间接危害比前两者更为严重、损失更为惨重（Brown *et al.*, 1995; 阎凤鸣和李大建, 2000）。如烟粉虱 MEAM1 隐种 *Bemisia tabaci*（Gennadius）MEAM1 可以传播番茄黄化曲叶病毒（tomato yellow leaf curl virus, TYLCV）（Varma and Malathi, 2003; Seal *et al.*, 2006）和烟草曲茎病毒（tobacco curly shoot virus, TbCSV）等（纠敏等, 2006）。

近 10 年来，我国粉虱类害虫入侵事件频发，已对我国农业生产造成了重创，如 20 世纪 90 年代，烟粉虱 MEAM1 入侵我国，使我国蔬菜、花卉等产业遭受了巨大损失（罗晨等, 2002）；2003 年烟粉虱 MED 隐种 *B. tabaci* MED 传入中国（褚栋等, 2005）；之后，螺旋粉虱 *Aleurodicus disperses* Russell（虞国跃等, 2007）、双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin（虞国跃等, 2010）等又接踵而至，对我国农业生产安全和生态安全构成了严重威胁。显然，粉虱类害虫的快速识别与准确鉴定是有效阻止其传入和进一步扩散的必要前提，同时也是粉虱类害虫有效防控的基础。

通常，粉虱类昆虫的识别鉴定主要依据 4 龄若虫亦即伪蛹/拟蛹的形态特征，其中皿状孔的特征最为常用。然而，在粉虱鉴定识别过程中发现，某些粉虱种类在伪蛹阶段存在表型变异现象，尤其是伯粉虱属 *Bemisia* 和蜡粉虱属 *Trialeurodes* 的种类（Mound, 1963; Russell, 1967; Pering, 2001），进而使同一物种不止一次地被描述，同物异名现象普遍（高祖紃, 1995; 罗志义和周婵敏, 2000）。显然，粉虱类害虫的准确识别尚需借助其他的技术与方法。2003 年，加拿大动物学家 Hebert 博士提出了 DNA 条形码概念，即以线粒体 DNA 细胞色素 C 氧化酶亚基 I（mitochondrial DNA cytochrome c oxidase subunit I, mtDNA COI）基因的一个片段作为物种鉴定的标准基因片段。由于基于 COI 基因 5′端设计的通用型引物对绝大多数动物物种具有较好的扩增效果，因此最为常用（Hebert *et al.*, 2003a, 2003b）。目前，基于 mtDNA COI 基因的 DNA 条形码技术已得到广泛应用。截止 2012 年的统计数据显示，DNA 条形码涉及的生物类群包括无脊椎动物、植物、鱼类、鸟类、原生生物、真菌、哺乳动物、两栖动物以及爬行动物等，其中，无脊椎动物的研究占 53.14%，而节肢动物研究的数量最多（Taylor and Harris, 2012）。与此同时，我国的 DNA 条形码技术研究也发展迅速，并取得了相当进展，如昆虫中的蓟马类（冯毅等, 2009; 乔玮娜等, 2012）、实蝇类（刘慎思等, 2012, 2014）以及海洋动物（李琪等, 2010; 李超伦等, 2011）等均证实 COI 基因 5′端片段完全可以用于常见生物类群的快速识别与种类鉴定。

众所周知，不同的基因其进化速率各异，而同一基因在不同的谱系中也可能存在不同的进化速率（Frati *et al.*, 1997; Caterino and Sperling, 1999）。然而，基因进化速率的异质性目前尚未得到足够的认识，尤其是在较低分类水平的系统发育研究中，进而给人们造成一种误解，亦即单纯地认为某一基因或进化快或进化慢；然而，由于 DNA 序列中某一特定区域可能存在功能限制，进而使上述推理不甚合理。如，Lunt 等（1996）将草地蝗虫与其他 8 种昆虫的 COI 基因在 DNA 水平与氨基酸序列水平分别进行比较分析，结果显示：序列的变异模式似乎与蛋白功能的限制存在关联，而且同一基因的不同区域进化速率不一，其中-COOH 末端变异性明显高于其他区域，而 COI 基因中心区域（M5 ~ M8）的变异则较低（Lunt *et al.*, 1996）。此外，根据数据库中现有粉虱类昆虫 COI 基因序列的数量可知，涉及 5′端序列的种类比较多，而涉及 3′端的碱基序列比较多。截

止 2013 年 5 月，GenBank 数据库（BOLD 数据库中的粉虱序列已经整合到 GenBank 中）中共有粉虱类昆虫 COI 基因序列 3 318 条，隶属 20 属 44 种；其中，只有 5′端序列的有 36 种/属，只有 3′端序列的有 11 种/属，既有 5′端序列又有 3′端序列的有 6 种/属；而最具入侵性的烟粉虱 MED 隐种和 MEAM1 隐种已知的碱基序列多位于 3′端（Boykin *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2010）。显然，在以分子生物学技术进行物种识别时，由于所扩增基因区域的不同，可能会使分析结果存在差异。

本研究围绕粉虱类害虫体型微小，形态相似，极易随蔬菜、花卉、水果及其种苗的贸易活动远距离传播，却难以快速准确识别的问题，以 COI 基因 3′端和 5′端序列为靶标，以新入侵我国的烟粉虱 MED、双钩巢粉虱、螺旋粉虱以及田间常见的其他 13 种粉虱类害虫为对象，采用 DNA 序列分析以及系统发育关系分析的技术与方法，通过对 3′端和 5′端序列的比对，探讨基于这些序列的 DNA 条形码技术用于粉虱类害虫种类分子鉴定的可行性，研究结果对粉虱类害虫的快速识别、防止入侵粉虱传入及其有效阻截具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 供试虫源

本实验中所使用的粉虱分别采自海南、湖南、云南等 8 个省份，于无水乙醇（分析纯，99.7%）中保存备用。粉虱的具体采集信息如表 1 所示。粉虱种类的鉴定主要通过数据库碱基序列比对分析与形态学鉴定（由河南农业大学植物保护学院阎凤鸣教授协助完成）。

1.2 总 DNA 提取

粉虱类昆虫总 DNA 的提取参照乔玮娜等（2012）的方法，并稍加改进。用软毛毛笔挑取单头粉虱成虫，放在滴有 20 μL 提取缓冲液（50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, 20 mmol/L NaCl, pH 8.0）的 Parafilm 膜上，以 0.2 mL PCR 管底部作为匀浆器，充分研磨匀浆，匀浆液移入 1.5 mL 离心管；然后，用 50 μL 缓冲液清洗匀浆器和 Parafilm 膜 4 次，移入同一离心管；加入 5 μL 蛋白酶 K（20 mg/mL），充分混匀后于 60℃水浴锅中水浴 1 h（中途混匀 1 次）；然后加入 220 μL 氯仿/异戊醇（v∶v = 24∶1），轻柔混匀数十次后，冰浴 30 min；以 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min，取上清液（约 200 μL）并加入 440 μL 预冷无水乙醇，轻轻混匀后在 –20℃冰箱放置 30 min；取出后，于 4℃ 12 000 r/min 离心 20 min，小心弃去上清液；加入 440 μL 预冷 75% 乙醇洗涤，4℃ 12 000 r/min 离心 15 min，小心弃去上清液。然后将离心管倒扣于洁净滤纸上，自然干燥 20 min，每管加入 20 μL 超纯水，充分溶解后于 –20℃保存备用。以生物分光光度计测定 DNA 浓度，以 OD_{260}/OD_{280} 值确定其是否被污染。

1.3 PCR 扩增、电泳检测以及序列测定

粉虱类昆虫 COI 基因的 5′端序列以通用型引物 LCO1490（5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′）和 HCO2198（5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′）扩增，片段长度约为 710 bp（Folmer *et al.*, 1994）；3′端序列以通用型引物 C1-J-2195（5′-TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAG-3′）和 L2-N-3014（5′-TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA-3′）扩增，片段长度约为 840 bp（Simon *et al.*, 1994）。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司协助合成。5′端序列扩增反应体系为 30 μL，其中 ddH_2O 23.8 μL，10 × buffer 3 μL，10 mmol/L dNTPs 0.6 μL，上游引物和下游引物（10 μmol/L）各 0.6 μL，*Taq* DNA 聚合酶（2.5 U/μL, NEB）0.4 μL，模板 DNA 1 μL。PCR 扩增程序为：94℃预变性 10 min；94℃ 30 s，52℃ 30 s，72℃ 10 min，35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。3′端序列扩增反应体系亦为 30 μL，其中 ddH_2O 22.5 μL，10 × buffer 3 μL，10 mmol/L dNTPs 0.6 μL，上游引物和下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，*Taq* DNA 聚合酶（2.5 U/μL, NEB）0.4 μL，模板 DNA 1.5 μL。PCR 扩增程序为：94℃预变性 10 min；94℃ 1 min，53℃ 1 min，72℃ 10 min，35 个循环；最后 72℃延伸 10 min。扩增反应在 Applied Biosystems Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler PCR 基因扩增仪上运行。PCR 产物于 4℃保存备用。

1.4 电泳检测及序列测定

分别取 3′端和 5′端 PCR 扩增产物 5 μL，在含有 GoldView（0.5 μg/mL）的 1.5%（重量）琼脂糖凝胶上，以 100 V 电泳分离（电泳缓冲液为 0.5 × TBE）45 min 后，以 Gel Doc Universal Hood II 型凝胶成像系统分析结果，将经电泳检测验证合格的 PCR 产物直接送北京三博远志生物技术有限公司进行双向测序。根据标本数量及 PCR 产物的质量，每种粉虱检测 3 ~ 9 头，共计检测 75 头，每头分别测定 COI 基因的 5′端与 3′端序列，获得 5′端序列 75 条、3′端序列 75 条，共计150条，将150条序列录入中国主要外

表 1 用于 DNA 序列分析的粉虱种类采集信息及序列登录号

Table 1 Collecting data of whitefly (Aleyrodidae) species used for DNA sequence analysis and the sequence accession numbers

编号 No.	种类 Species	寄主植物 Host plant	采集地点 Collecting locality	采集日期 Collecting date	采集人 Collector	测序样本数 Number of samples sequenced		序列登录号* Sequence accession number	
						5′端 5′-end	3′端 3′-end	5′端 5′-end	3′端 3′-end
1	烟粉虱 MED *Bemisia tabaci* (Gennadius) MED	番茄 *Solanum lycopersicum* L.	北京朝阳 Chaoyang, Beijing	2012-07-12	李小凤 Li Xiao-Feng	3	3	YFSQ. 2012. 100018. 5. 1-3	YFSQ. 2012. 100018. 3. 1-3
		苘麻 *Abutilon theophrasti* Medicus	北京丰台 Fengtai, Beijing	2012-08-13	李小凤 Li Xiao-Feng	4	4	YFSQ. 2012. 100039. 5. 1-4	YFSQ. 2012. 100039. 3. 1-4
		黄瓜 *Cucumis sativus* L.	湖南长沙 Changsha, Hunan	2012-07-15	岳雷 Yue Lei	2	2	YFSQ. 2012. 410000. 5. 1-2	YFSQ. 2012. 410000. 3. 1-2
2	烟粉虱 Asia II 3 *B. tabaci* Asia II 3	棉花 *Gossypium hirsutum* L.	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2006-03-04	刘树生 Liu Shu-Sheng	3	3	YFSZ1. 2006. 310058. 5. 1-3	YFSZ1. 2006. 310058. 3. 1-3
3	烟粉虱 Asia II 1 *B. tabaci* Asia II 1	棉花 *G. hirsutum*	浙江杭州 Hangzhou, Zhejiang	2006-03-04	刘树生 Liu Shu-Sheng	4	4	YFSZ2. 2006. 310058. 5. 1-4	YFSZ2. 2006. 310058. 3. 1-4
4	烟粉虱 China 1 *B. tabaci* China 1	苎麻 *Boehmeria nivea* L.	湖南衡阳 Hengyang, Hunan	2012-10-02	龙楚云 Long Chu-Yun	4	4	YFSZ3. 2012. 421000. 5. 1-4	YFSZ3. 2012. 421000. 3. 1-4
5	烟粉虱 Asia II 7 *B. tabaci* Asia II 7	鬼针草 *Bidens pilosa* L.	广东汕头 Shantou, Guangdong	2012-08-17	田虎 Tian Hu	4	4	YFSCV. 2012. 515073. 5. 1-4	YFSCV. 2012. 515073. 3. 1-4
6	烟粉虱 Asia I *B. tabaci* Asia I	番茄 *S. lycopersicum*	海南海口 Haikou, Hainan	2012-11-15	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	YFSAI. 2012. 674800. 5. 1-3	YFSAI. 2012. 674800. 3. 1-3
		南瓜 *Cucurbita moschata* Duch.	云南文山 Wenshan, Yunnan	2011-12-03	张桂芬 Zhang Gui-Fen	2	2	YFSAI. 2011. 663000. 5. 1-2	YFSAI. 2011. 663000. 1-2
7	非洲小粉虱 *B. afer* (Priesner & Hosny)	月季 *Rosa chinensis* Jacq.	北京海淀 Haidian, Beijing	2012-08-21	张桂芬 Zhang Gui-Fen	5	5	FZXFS. 2012. 100086. 5. 1-5	FZXFS. 2012. 100086. 3. 1-5
8	双钩巢粉虱 *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin	番荔枝 *Annona squamosa* L.	云南玉溪 Yuxi, Yunnan	2012-10-30	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	SGCFS. 2012. 653300. 5. 1-3	SGCFS. 2012. 653300. 3. 1-3
		小叶榕 *Ficus concinna* (Miq.) Miq.	海南海口 Haikou, Hainan	2012-11-15	张桂芬 Zhang Gui-Fen	2	2	SGCFS. 2012. 570100. 5. 1-2	SGCFS. 2012. 570100. 3. 1-2
9	刺槐粉虱 *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance)	羊蹄甲 *Bauhinia purpurea* L.	福建福州 Fuzhou, Fujian	2011-11-22	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	CHFS. 2011. 350000. 5. 1-3	CHFS. 2011. 350000. 3. 1-3

续表 1 Table 1 continued

编号 No.	种类 Species	寄主植物 Host plant	采集地点 Collecting locality	采集日期 Collecting date	采集人 Collector	测序样本数 Number of samples sequenced		序列登录号* Sequence accession number	
						5′端 5′-end	3′端 3′-end	5′端 5′-end	3′端 3′-end
10	榕粉虱 *Massilieurodes fici* Takahashi	小叶榕 *F. concinna*	海南海口 Haikou, Hainan	2012-11-15	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	RFS. 2012. 570100. 5. 1-3	RFS. 2012. 570100. 3. 4-6
		小叶榕 *F. concinna*	福建漳州 Zhangzhou, Fujian	2011-11-22	张桂芬 Zhang Gui-Fen	1	1	RFS. 2011. 363100. 5. 1	RFS. 2011. 363100. 3. 1
11	温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)	一串红 *Salvia splendens* Ker-Gawler	北京朝阳 Chaoyang, Beijing	2012-07-12	李小凤 Li Xiao-Feng	4	4	WSFS. 2012. 100018. 5. 1-4	WSFS. 2012. 100018. 3. 1-4
12	螺旋粉虱 *Aleurodicus dispersus* Russell	番石榴 *Psidium guajava* L.	云南景洪 Jinghong, Yunnan	2012. -10-31	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	LXFS. 2012. 666100. 5. 1-3	LXFS. 2012. 666100. 3. 1-3
13	灰粉虱 *Siphoninus phillyreae* (Haliday)	石榴 *Punica granatum* L.	上海闵行 Minhang, Shanghai	2012-09-27	张桂芬 Zhang Gui-Fen	5	5	DJXFS. 2012. 201199. 5. 1-5	DJXFS. 2012. 201199. 3. 1-5
14	桑粉虱 *Pealius mori* Takahashi	桑树 *Morus alba* L.	北京海淀 Haidian, Beijing	2013-08-16	张桂芬 Zhang Gui-Fen	7	7	SFS. 2013. 100086. 5. 1-7	SFS. 2013. 100086. 3. 1-7
15	库社瘤粉虱 *Aleurotuberculatus kusheriki* Mound	龙船花 *Ixora chinensis* Lam.	海南海口 Haikou, Hainan	2012-11-15	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	KSLFS. 2012. 570105. 5. 1-3	KSLFS. 2012. 570105. 3. 1-3
16	庞达巢粉虱 *Paraleyrodes bondari* Peracchi	荔枝 *Litchi chinensis* Sonn	海南儋州 Danzhou, Hainan	2012-11-17	张桂芬 Zhang Gui-Fen	3	3	PDCFS2012. 571101. 5. 1-3	PDCFS. 2012. 571101. 3. 4-6
		苦买菜 *Lactuca indic* L.	云南景洪 Jinghong, Yunan	2012-10-31	张桂芬 Zhang Gui-Fen	2	2	PDCFS. 2012. 666109. 5. 1-2	PDCFS. 2012. 666109. 3. 1-2
		重阳木 *Bischofia polycarpa* (Levl.) Airy Shaw	海南海口 Haikou, Hainan	2012. 11. 15	李小凤 Li Xiao-Feng	2	2	PDCFS. 2012. 570100. 5. 1-2	PDCFS. 2012. 570100. 5. 1-2

* 中国外来入侵物种数据库 Database of Invasive Alien Species in China (http://www. chinaias. cn).

来入侵昆虫 DNA 条形码识别系统(http://www.chinaias.cn),其序列登录号如表 1 所示。

1.5　COI 基因序列分析

用 DNAMAN 软件读取序列,并对每条序列进行人工碱基读取和反复校对,以确保序列的高质量。用 Bioedit 7.0 软件对序列进行整合处理,以 ClustalW Multiple Alignment 软件进行对齐处理;并利用 GenBank 数据库(BOLD 数据库中的粉虱序列已经整合到 GenBank 数据库序列)对所获得的高质量 COI 基因序列与数据库中已公开的粉虱类碱基序列进行同源性比对分析。然后,以菜豆根蚜 *Smynthurodes betae* Westwood (GenBank 登录号: AY227078.1)为外群,采用 MEGA 5.10 软件以 Kimura 2-parameter 双参数模型(K2-P)分别计算种内及种间遗传距离(Kimura, 1980; Tamura *et al.*, 2011)。最后,分别以 5′端和 3′端序列为靶标,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,系统发育树分支的置信度采用自展法(bootstrap analysis, BP)重复检测 1 000 次。

2　结果与分析

2.1　PCR 扩增、序列测定及同源性分析

以 16 种粉虱的 DNA 为模板,分别采用 5′端通用型引物 LCO1490/HCO2198 和 3′端通用型引物 C1-J-2195/ L2-N-3014 进行 PCR 扩增,电泳检测结果显示,每种粉虱均可扩增出清晰的 5′端(图 1: A)和 3′端靶标片段(图 1: B)。对电泳检测验证合格的 PCR 产物进行纯化和碱基序列测定,以 Bioedit 7.0 软件进行整合处理,ClustalW Multiple Alignment 软件进行对齐处理,修剪成长度分别为 641 bp 和 738 bp 的片段。然后,对所获得的高质量 COI 基因序列与数据库(GenBank)中已公开的粉虱类昆虫碱基序列进行同源性比对分析(BOLD 数据库中粉虱序列已经整合到 GenBank 中)。结果表明,本研究中 16 种粉虱的 COI 基因的 3′端和 5′端碱基序列与数据库中已知的靶标种相对应的 COI 基因片段的同源性均为 99.0 ~ 100%,表明所获得的 COI 基因 3′端和 5′端序列准确可靠。

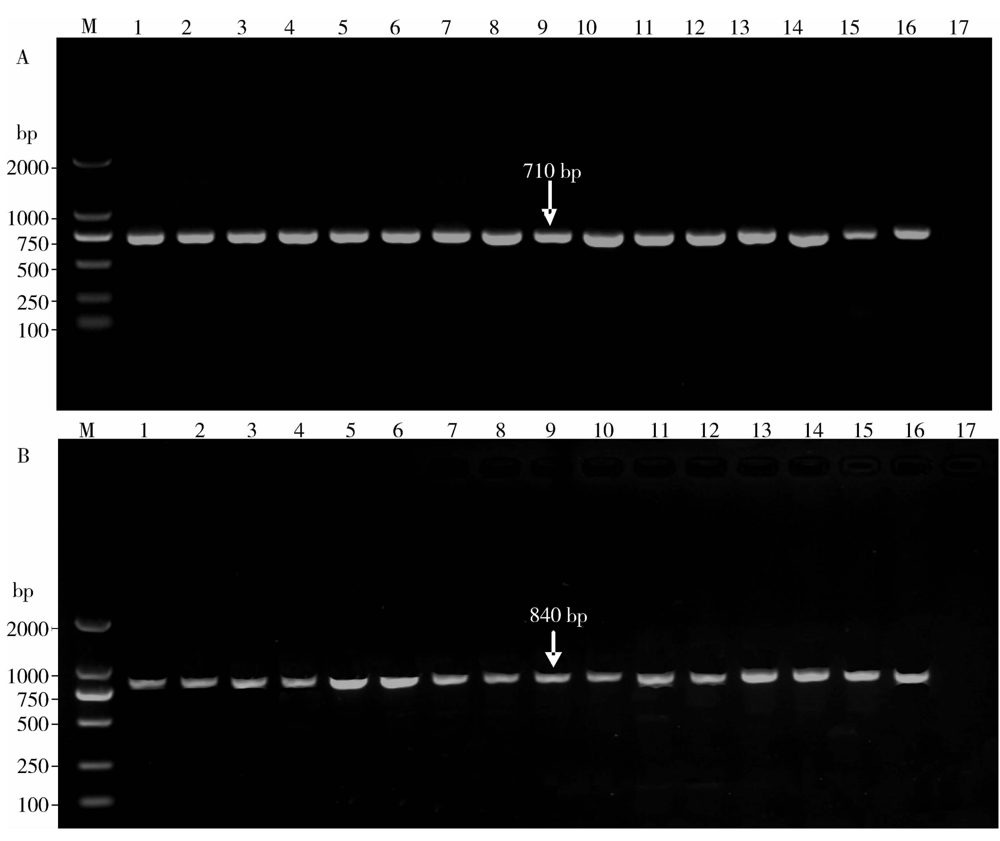


图 1　引物 LCO1490/HCO2198 和 C1-J-2195/L2-N-3014 分别对 16 种粉虱 COI 基因 5′端(A)和 3′端(B)序列的扩增电泳检测图

Fig. 1　Amplification patterns of the 5′-end (A) and 3′-end (B) of COI gene in the 16 whitefly species using the universal DNA primers LCO1490/HCO2198 and C1-J-2195/L2-N-3014, respectively

M: DNA 分子量标准 DNA ladder; 1 – 16: 粉虱物种编号, 同表 1 (Species no. of whitefly species, the same as in Table 1); 17: 阴性对照(水) Negative control (water).

2.2 种内与种间遗传距离

分别以 COI 基因 5′端和 3′端序列为靶标，运用 MEGA 5.10 中的 K2-P 模型分析计算 16 种粉虱的种内与种间遗传距离。结果显示，当以 5′端序列为靶标时，种内遗传距离为 0.0000～0.0039，平均为 0.0015；种间遗传距离为 0.1009～0.3846，平均为 0.2897。其中烟粉虱 Asia II 7 隐种与 Asia II 1 隐种间遗传距离最小，为 0.1009；烟粉虱 Asia II 1 隐种与温室粉虱的种间遗传距离最大，为 0.3846（表 2）。而且，种内遗传距离与种间遗传距离没有重叠区域（图 2：A）。当以 3′端序列为靶标时，种内遗传距离为 0.0000～0.0060，平均为 0.0007；种间遗传距离为 0.0000～0.3687，平均为 0.2817；其中烟粉虱 Asia II 3 隐种与桑粉虱 *P. mori* 的种间遗传距离最小，为 0.0000，存在种内遗传距离与种间遗传距离重叠现象（图 2：B），烟粉虱 Asia II 1 隐种与温室粉虱的种间遗传距离最大，为 0.3687（表 3）。

表 2 基于 5′端序列计算的 16 种粉虱种间与种内遗传距离

Table 2 Intra- and inter-species genetic distances of the 16 whitefly species based on the 5′-end sequence

	种间 Inter-species																种内
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Intra-species
1																	0.0034
2	0.1471																0.0000
3	0.1677	0.1201															0.0016
4	0.1334	0.1316	0.1467														0.0000
5	0.1642	0.1074	0.1009	0.1364													0.0018
6	0.1632	0.1411	0.1698	0.1396	0.1524												0.0022
7	0.2604	0.2556	0.2562	0.2491	0.2747	0.2518											0.0038
8	0.2992	0.3177	0.3090	0.3022	0.3189	0.3072	0.2835										0.0000
9	0.3353	0.3498	0.3424	0.3379	0.3466	0.3276	0.3651	0.2850									0.0010
10	0.3077	0.3102	0.3174	0.3123	0.2958	0.3105	0.3074	0.3123	0.3118								0.0039
11	0.3602	0.3734	0.3846	0.3443	0.3829	0.3646	0.3549	0.3447	0.3479	0.3624							0.0000
12	0.2959	0.3127	0.3218	0.3069	0.3131	0.3112	0.3161	0.2176	0.3362	0.3519	0.3384						0.0000
13	0.2971	0.3119	0.3225	0.2989	0.3021	0.3225	0.2921	0.3052	0.2988	0.2860	0.3270	0.3191					0.0025
14	0.2947	0.3153	0.3182	0.3058	0.3205	0.3096	0.3138	0.2786	0.2723	0.2955	0.3230	0.2781	0.2837				0.0000
15	0.2947	0.3153	0.3182	0.3058	0.3205	0.3096	0.3138	0.2786	0.2723	0.2955	0.3230	0.2781	0.2837	0.2583			0.0037
16	0.3197	0.3393	0.3245	0.3303	0.3209	0.3360	0.3336	0.2077	0.3544	0.3308	0.3461	0.2606	0.3153	0.3240	0.2973		0.0000

1－16：粉虱种类编号，同表 1（Species no. of whitefly species, the same as Table 1）.

表 3 基于 3′端序列计算的 16 种粉虱种间与种内遗传距离

Table 3 Intra-and inter-species genetic distances of the 16 whitefly species based on the 3′ end sequence

	种间 Inter-species																种内
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Intra-species
1																	0.0015
2	0.1825																0.0009
3	0.1804	0.1321															0.0000
4	0.1699	0.1617	0.1575														0.0000
5	0.1826	0.1315	0.1072	0.1615													0.0000
6	0.1720	0.1780	0.1553	0.1332	0.1446												0.0019
7	0.2484	0.2748	0.2720	0.2625	0.2843	0.2680											0.0060
8	0.2947	0.3293	0.3254	0.3135	0.3320	0.2960	0.3239										0.0000
9	0.3200	0.3352	0.3174	0.3175	0.3230	0.3193	0.2939	0.2946									0.0000
10	0.3060	0.3472	0.3214	0.3172	0.3329	0.3317	0.3134	0.3507	0.3202								0.0000
11	0.3508	0.3687	0.3639	0.3501	0.3572	0.3525	0.3569	0.3409	0.3210	0.3464							0.0000
12	0.3130	0.3288	0.3214	0.3104	0.3200	0.2940	0.3079	0.1828	0.2990	0.3612	0.3360						0.0000
13	0.2991	0.3156	0.3106	0.2930	0.2910	0.2956	0.3004	0.2901	0.2990	0.3180	0.3237	0.2743					0.0000
14	0.1805	0.1322	0.0000	0.1576	0.1073	0.1554	0.2722	0.3257	0.3176	0.3216	0.3642	0.3217	0.3108				0.0000
15	0.3345	0.3203	0.3451	0.3220	0.3267	0.3304	0.3226	0.2666	0.3190	0.3174	0.3335	0.3016	0.2919	0.3453			0.0000
16	0.2984	0.2967	0.3087	0.2844	0.3138	0.2787	0.2928	0.1868	0.2972	0.3559	0.3305	0.2005	0.2887	0.3090	0.3025		0.0004

1－16：粉虱种类编号，同表 1（Species no. of whitefly species, the same as Table 1）.

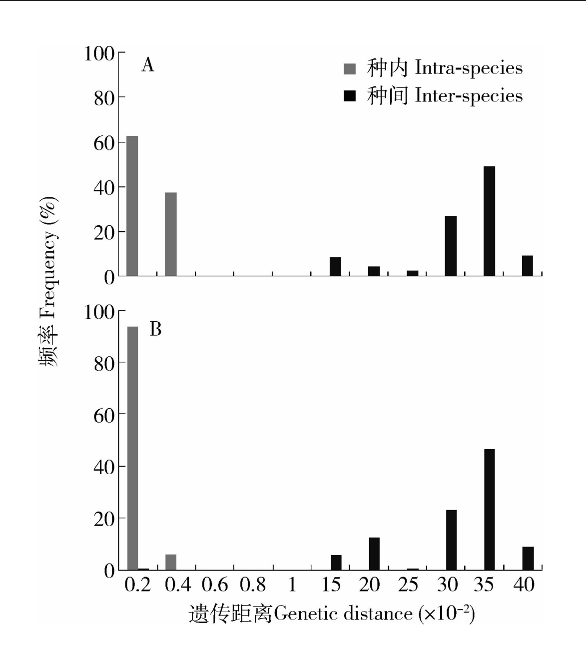


图 2　基于 COI 基因 5′端（A）和 3′端（B）序列计算的 16 种粉虱种内、种间遗传距离分布频率

Fig. 2　Frequency distribution of the intra- and inter-species genetic distances of the 16 whitefly species based on 5′-end (A) and 3′-end (B) sequences of COI gene

2.3　系统发育树分析

分别以 16 种粉虱 5′端（75 条）与 3′端（75 条）序列为靶标，以菜豆根蚜为外群，以邻接法构建系统发育树。聚类分析结果表明，当以 5′端序列为靶标时，16 种粉虱分别形成独立的进化分支，而且最初分支自展值均为 99%（图 3：A）。当以 3′端序列为靶标时，桑粉虱却与烟粉虱 Asia II 1 隐种聚为了一支；而其余种类的粉虱均可形成独立的进化分支（图 3：B）。此外，分别以 5′端和 3′端序列为靶标构建的系统发育树均可以将巢粉虱属 *Paraleyrodes* 与螺旋粉虱聚为一支，并同时将伯粉虱属 *Bemisia* 中烟粉虱的不同隐种和非洲小粉虱聚为了一支（图 3）。

3　结论与讨论

Roe 和 Sperling（2007）在对部分昆虫 COI 和 COII 基因的进化模式进行分析时发现，在整个 COI 和 COII 基因中，核苷酸的变化是非均质的，并将其归纳为 4 种影响物种区分与诊断的模式，即（1）种内、种间遗传距离是否重叠；（2）是否存在易感性突变位点；（3）所分析的基因片段的大小及其位置的分化程度；（4）DNA 的饱和性。所以，同一基因不同片段碱基序列差异性的比较分析有助于提高物种识别鉴定的准确性。

本研究以新入侵我国的以及田间常见的 16 种粉虱为靶标，分别采用通用型引物 LCO1490/HCO2198 与 C1-J-2195/L2-N-3014 扩增 COI 基因的 5′端与 3′端序列，种内、种间遗传距离分析结果表明，当以 5′端序列为靶标时，种内平均遗传距离为 0.0015，种间平均遗传距离为 0.2897（0.1009 ~ 0.3846），种间遗传距离为种内遗传距离的 193.1 倍；而且种内遗传距离与种间遗传距离没有重叠区域（图 2：A），完全符合 DNA 条形码有效性的检验标准（Hebert *et al.*, 2003a）。然而当以 3′端为靶标时，种内平均遗传距离为 0.0007；种间遗传距离平均为 0.2817（0.0010 ~ 0.3687）；尽管种间遗传距离为种内遗传距离的 402.4 倍，但桑粉虱和烟粉虱 Asia II 1 隐种的种内遗传距离与种间遗传距离重叠（图 2：B），不能有效地区分桑粉虱和烟粉虱 Asia II 1 隐种。进一步的系统发育分析显示，当以 5′端序列为靶标时，16 种粉虱分别形成独立的进化分支（图 3：A），而当以 3′端序列为靶标时，桑粉虱与烟粉虱 Asia II 1 隐种聚为一支，应为同一种类（图 3：B）。进而表明，COI 基因 5′端序列更适宜作为物种识别鉴定的 DNA 条形码标准区域。

目前，基于 mtDNA COI 基因的粉虱类害虫系统发育分析的研究鲜见报道，而有关烟粉虱隐种的系统发育研究却时有发表。例如，Boykin 等（2007）首次采用 COI 基因对烟粉虱进行综合的系统发育分析指出，烟粉虱是一个至少存在 24 个形态学相近的物种复合体，这些物种可以通过 COI 基因 3′端序列进行明确区分；并认为在遗传距离比较分析中，当以 11% 为界定标准时，可以将烟粉虱划分为 11 个遗传群（genetic group）；当以 3.5% 为界定标准时，可以将烟粉虱划分为 24 个遗传群。本实验以 COI 基因 3′端序列为靶标的研究结果与 Boykin 等（2007）的研究结果一致。Dinsdale 等（2010）研究指出应以大于或等于 3.5% 的遗传分化水平作为烟粉虱物种鉴定的界限，并认为烟粉虱至少存在 24 个隐种。此后，在我国又发现了 4 个隐种（Hu *et al.*, 2011）；阿根廷发现了 1 个隐种（Alemandri *et al.*, 2012）；Firdaus 等（2013）以 COI 基因 3′端序列为靶标对烟粉虱 407 个单倍型进行分析时又发现 7 个新的隐种。至此烟粉虱隐种已经多达 36 个。同时，本研究还发现，以 5′端序列为靶标同样可以有效地区分不同的烟粉虱隐种（隐种间遗传距离为 0.1010 ~ 0.1730）（表 2），可用于烟粉虱隐种的识别与鉴定。

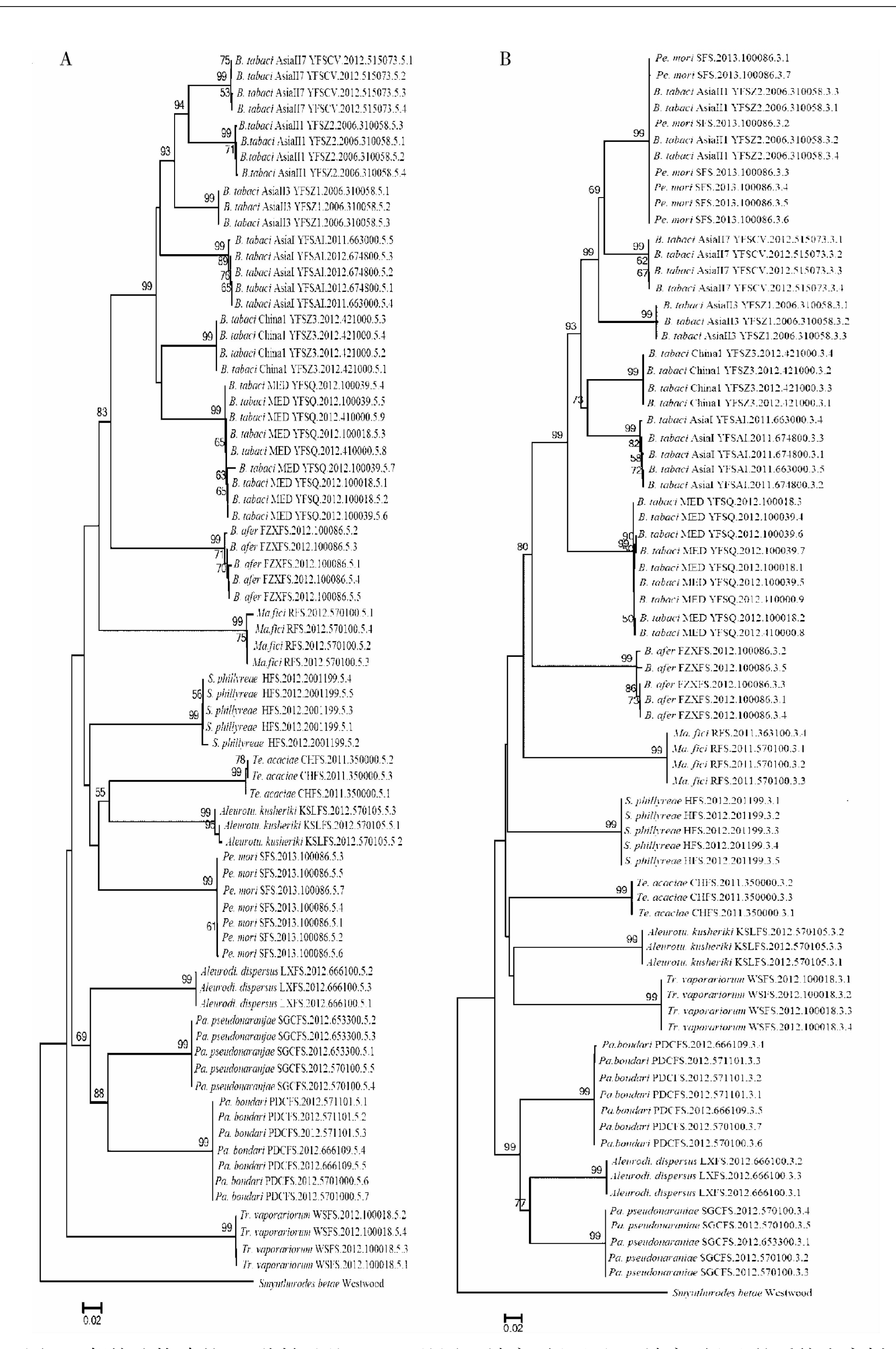


图 3 邻接法构建的 16 种粉虱基于 COI 基因 5′端序列(A)和 3′端序列(B)的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on the 5′-end (A) and 3′-end sequences (B) of the COI gene of the 16 whitefly species

分支处上方数值表示重复 1 000 次后的自展值(>50%);标尺示遗传距离。Numbers above branches are bootstrap values (>50%) under 1 000 replicates. The scale bar represents the genetic distance. *B.*: 伯粉虱属 *Bemisia*; *Pe.*: 皮粉虱属 *Pealius*; *S.*: *Siphoninus*; *Ma.*: 麻粉虱属 *Massilieurodes*; *Tr.*: 蜡粉虱属 *Trialeurodes*; *Aleurotu.*: 瘤粉虱属 *Aleurotuberculatus*; *Te.*: 草粉虱属 *Tetraleurodes*; *Aleurodi.*: 盘粉虱属 *Aleurodicus*; *Pa.*: 巢粉虱属 *Paraleyrodes*.

参考文献(References)

Alemandri V, De Barro P, Bejerman N, Caro EBA, Dumón AD, Mattio MF, Rodriguez SM, Truol G, 2012. Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *Journal of Economic Entomology*, 105 (1): 48 – 53.

Boykin LM, Shatters RGJr, Rosell RC, McKenzie CL, Bagnall RA, De Barro P, Frohlich DR, 2007. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 1306 – 1319.

Brown JK, Frohlich DR, Rosell RC, 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology*, 40: 511 – 534.

Caterino MS, Sperling FAH, 1999. *Papilio* phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11(1): 122 – 137.

Chu D, Liu GX, Wan FH, Tao YL, Gill RJ, 2010. Phylogenetic analysis and rapid identification of the whitefly, *Bemisia afer*, in China. *Journal of Insect Science*, 10(86): 1 – 9.

Chu D, Zhang YJ, Cong B, Xu BY, Wu QJ, Zhu GR, 2005. Sequence analysis of mtDNA COI gene and molecular phylogeny of different geographical populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Scientia Agricultura Sinica*, 38(1): 76 – 85. [褚栋，张友军，丛斌，徐宝云，吴青君，朱国仁，2005. 烟粉虱不同地理种群的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 中国农业科学，38(1): 76 – 85]

Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, De Barro P, 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103 (2): 196 – 208.

Feng Y, Wang L, Bai YF, Wang J, Feng JN, 2009. Molecular identification of *Frankliniella* based on COI sequences by DNA barcoding chip. *Biotechnology Bulletin*, (8): 169 – 173. [冯毅，王莉，白云峰，王洁，冯纪年，2009. 基于 COI 序列快速鉴定花蓟马的 DNA 条形码芯片初探. 生物技术通报，(8): 169 – 173]

Firdaus S, Vosman B, Hidayati N, Supena EDJ, Visser RGF, van Heusden AW, 2013. The *Bemisia tabaci* species complex: additions from different parts of the world. *Insect Science*, 20: 723 – 733.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294 – 299.

Frati F, Simon C, Sullivan J, Swofford DL, 1997. Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in Collembola. *Journal of Molecular Evolution*, 44: 145 – 158.

Gao ZX, 1995. Revision on the scientific name of mulberry whitefly. *Journal of Zhejiang Agricultural University*, 21(2): 207. [高祖紃，1995. 桑粉虱学名订正. 浙江农业大学学报，21(2): 207]

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of Royal Society of London Biological Sciences*, 270: 313 – 321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, de Waard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 270(1): S96 – S99.

Hu J, De Barro P, Zhao H, Wang J, Nardi F, Liu SS, 2011. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS ONE*, 6(1): e16061.

Jiu M, Zhou XP, Liu SS, 2006. Acquisition and transmission of *Tobacco curly shoot virus* by the B biotype of the whitefly, *Bemisia tabaci*. *Acta Phytophylacica Sinica*, 33(2): 168 – 172. [纠敏，周雪平，刘树生，2006. B 型烟粉虱携带传播烟草曲茎病毒的能力. 植物保护学报，33(2): 168 – 172]

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111 – 120.

Li CL, Wang MX, Cheng FP, Sun S, 2011. DNA barcoding and its application to marine zooplankton ecology. *Biodiversity Science*, 19 (6): 805 – 814. [李超伦，王敏晓，程方平，孙松，2011. DNA 条形码及其在海洋浮游动物生态学研究中的应用. 生物多样性，19(6): 805 – 814]

Li Q, Zou SM, Zheng XD, Kong LF, Yu RH, 2010. DNA barcoding and its applications in marine organisms. *Periodical of Ocean University of China*, 40(8): 43 – 47. [李琪，邹山梅，郑小东，孔令峰，于瑞海，2010. DNA 条形码及其在海洋生物中的应用. 中国海洋大学学报，40(8): 43 – 47]

Liu SS, Zhang GF, Wan FH, 2014. DNA barcoding and phylogenetic analysis of common species of the genus *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on mtDNA COI gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 57(3): 343 – 355. [刘慎思，张桂芬，万方浩，2014. 基于 mtDNA COI 基因的离腹寡毛实蝇属常见种 DNA 条形码识别和系统发育分析. 昆虫学报，57(3): 343 – 355]

Liu SS, Zhang GF, Wu Q, Zhang AB, Wang JJ, Wan FH, 2012. Establishment and application of DNA barcoding technology for identification of the immatures and adult debris of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55 (3): 336 – 343. [刘慎思，张桂芬，武强，张爱兵，王进军，万方浩，2012. 桔小实蝇幼体及成虫残体 DNA 条形码识别技术的建立与应用. 昆虫学报，55(3): 336 – 343]

Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM, 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3): 153 – 165.

Luo C, Yao Y, Wang RJ, Yan FM, Hu DX, Zhang ZL, 2002. The use of mitochondrial cytochrome oxidase I (mt COI) gene sequences for the identification of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 45(6): 759 – 763. [罗晨，姚远，王戎疆，阎凤鸣，胡敦孝，张芝利，2002. 利用 mtDNA COI 基因序列鉴定我国烟粉虱的生物型. 昆虫学报，45(6): 759 – 763]

Luo ZY, Zhou CM, 2000. The record of whiteflies on the citrus. *South China Fruits*, 29(6): 15 – 17. [罗志义，周婵敏，2000. 中国柑桔粉虱记录. 中国南方果树，29(6): 15 – 17]

Martin JH, Mound LA, 2007. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). *Zootaxa*, 1492: 1 – 84.

Mound LA, 1963. Host-correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). *Proceedings of the Royal Entomological Society of London, Series A, General Entomology*, 38: 171 – 180.

Pering TM, 2001. The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*,

20: 725 - 737.

Qiao WN, Wan FH, Zhang AB, Min L, Zhang GF, 2012. Application of DNA barcoding technology for species identification of common thrips (Insecta: Thysanoptera) in China. *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 344 - 356. [乔玮娜, 万方浩, 张爱兵, 闵亮, 张桂芬, 2012. DNA 条形码技术在田间常见蓟马种类识别中的应用. 昆虫学报, 55(3): 344 - 356]

Roe AD, Sperling FAH, 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome coxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 325 - 345.

Russell LM, 1967. The North American species of whiteflies of the genus *Trialeurodes*. *The Florida Entomologist*, 50(4): 235 - 241.

Seal SE, VandenBosch F, Jeger MJ, 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1): 23 - 46.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flooks P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651 - 701.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 - 2739.

Taylor HR, Harris WE, 2012. An emergent science on the brink of irrelevance: a review of the past 8 years of DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12: 377 - 388.

Varma A, Malathi VG, 2003. Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142: 145 - 164.

Yan FM, Li DJ, 2000. The basic profile of whiteflies classification and the identification of common whiteflies in China. *Beijing Agricultural Sciences*, 18(Suppl.): 20 - 30. [阎凤鸣, 李大建, 2000. 粉虱分类的基本概况和我国常见种的识别. 北京农业科学, 18(增刊): 20 - 30]

Yu GY, Fu YG, Xian ZH, 2010. An alien whitefly, *Paraleyrodes pseudonaranjae* Martin, found in Hainan and Guangxi, China. *Journal of Environmental Entomology*, 32(2): 275 - 279. [虞国跃, 符悦冠, 贤振华, 2010. 海南、广西发现外来双钩巢粉虱. 环境昆虫学报, 32(2): 275 - 279]

Yu GY, Zhang GL, Peng ZQ, Liu K, Fu YG, 2007. The spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, invaded Hainan Island of China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 44(3): 428 - 431. [虞国跃, 张国良, 彭正强, 刘奎, 符悦冠, 2007. 螺旋粉虱入侵我国海南. 昆虫知识, 44(3): 428 - 431]

Zhu WJ, Fu YG, 2013. The Aleyrodidae (Hemiptera, Sternorrhyncha) of Hainan Island, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 38(3): 647 - 656. [朱文静, 符悦冠, 2013. 海南岛粉虱科昆虫种类及中国四新纪录种记述(半翅目, 胸喙亚目). 动物分类学报, 38(3): 647 - 656]

(责任编辑: 袁德成)